

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JC996 U.S. PTO
09/847548
05/02/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

#A
19 Jul 01
R. Talbot

出 願 年 月 日
Date of Application:

2000年 7月 6日

出 願 番 号
Application Number:

特願2000-205265

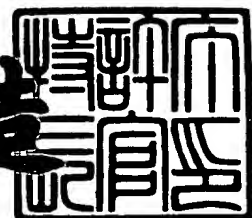
出 願 人
Applicant (s):

日本レーザ電子株式会社

2001年 3月23日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3023442

【書類名】 特許願

【整理番号】 200071

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 名古屋市熱田区三本松町 2 0 番 9 号 日本レーザ電子株式会社内

【氏名】 田島 晴雄

【発明者】

【住所又は居所】 名古屋市熱田区三本松町 2 0 番 9 号 日本レーザ電子株式会社内

【氏名】 米田 英克

【特許出願人】

【識別番号】 000230467

【氏名又は名称】 日本レーザ電子株式会社

【代表者】 米田 勝實

【代理人】

【識別番号】 100081466

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 研一

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 055402

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 試料チップ解析装置及び解析方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 入射される光を全反射して導波可能で、表面に多数の試料プローブが固定される導波板と、該導波板の端面から内部に光を照射する光源と、試料プローブが固定された導波板の表面を撮像する撮像部材とを備え、試料プローブに対して蛍光物質が標識された被解析用試料が結合された導波板内にて光を全反射させて導波する際に生じるエバネッセン波により蛍光物質を励起し、撮像された導波板の蛍光像により被解析用試料を解析可能にした試料チップ解析装置。

【請求項 2】 表面に多数の試料プローブが固定された導波板内部に光源からの光を入射させて導波する際の全反射により生じるエバネッセン波により試料プローブに結合された被解析用試料に標識された蛍光物質を励起して蛍光させた導波板の像に基づいて蛍光箇所の試料プローブにより被解析用試料を解析する試料チップ解析方法。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 において、導波板はガラス基板とした試料チップ解析装置及び解析方法。

【請求項 4】 請求項 1 又は 2 において、導波板は一對の絶縁反射板を所定の間隔をおいて相対配置した試料チップ解析装置及び解析方法。

【請求項 5】 請求項 1 又は 2 において、光源は白色光を出力する試料チップ解析装置及び解析方法。

【請求項 6】 請求項 1 又は 2 において、光源は標識された蛍光物質を励起させる波長の光を出力する試料チップ解析装置及び解析方法。

【請求項 7】 請求項 1 又は 2 において、試料プローブ及び被解析用試料はポリヌクレオチド、ペプチド及び蛋白質のいずれかとした試料チップ解析装置及び解析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

この発明は、細胞や生体組織の遺伝子発現態様を解析したり、抗原抗体反応を

解析したりする試料チップ解析装置及び解析方法に関する。

【0002】

【発明が解決しようとする課題】

上記用途にあつては、スライドガラス上にDNAプローブやRNAプローブ等のポリヌクレオチドや蛋白質のペプチドプローブ等の各種試料プローブを、高密度（数十～数万個／ cm^2 ）にドット配列して固定した試料チップを使用している。

【0003】

そして、例えば遺伝子発現態様を解析する際には、試料チップ上の各試料プローブに対して細胞や生体組織から抽出されて調整されると共に蛍光物質が標識された被解析用試料を付着させ、付着した試料プローブと被解析用試料とが相補的關係の場合には結合し、反対に非相補的關係の場合には非結合になる。

【0004】

そして緩衝液により試料プローブに対して非結合の被解析用試料を洗い流した後、試料チップ表面を光学的に走査して蛍光物質からの蛍光を検出することにより被解析用試料が結合した試料プローブに基づいて被解析用試料を特定している。

【0005】

試料チップを光学的に走査するには、光源から光を試料チップ表面に所定のビーム径で収束させて照射しながら試料チップからの光を受光する対物レンズ及び試料チップを相対的に二次元移動させることにより試料チップ全体を光学的に走査して蛍光物質を励起させている。

【0006】

この方法にあつては受光部材に蛍光物質からの蛍光と共に反射した蛍光物質の励起光も一緒に受光されるため、蛍光と励起光とを選別する光学的フィルターを設ける必要があるが、蛍光に比べて反射励起光の強度が極めて高いため、蛍光検出に際して励起光の影響を受け易く、蛍光検出精度が悪かった。

【0007】

また、蛍光物質から励起される蛍光を効率的に受光するには対物レンズの受光可

能範囲を広げる必要からその径を大きくする必要があり、光照射装置が大型化する問題をも有していた。

【 0 0 0 8 】

更に、外乱光（ノイズ）の影響を低くして蛍光の検出精度を上げるには、試料チップに対して対物レンズを可及的に近接させる必要があるが、対物レンズの物理的特性により近接距離に限界があり、蛍光を高精度に検出できない問題をも有している。

【 0 0 0 9 】

本発明は、上記した従来の欠点を解決するために発明されたものであり、その課題とする処は、蛍光物質の励起光や外乱光に影響されることなく試料プローブに結合された被解析用試料に標識された蛍光物質からの蛍光を確実、かつ高精度に検出して被解析用試料の解析作業を効率化することができる試料チップ解析装置及び解析方法を提供することにある。

【 0 0 1 0 】

本発明の他の課題は、一度に異なる波長の蛍光を高精度に検出して解析作業を効率化することができる試料チップ解析装置及び解析方法を提供することにある。

【 0 0 1 1 】

【課題を解決するための手段】

請求項 1 の発明は、表面に多数の試料プローブが固定される導波板と、該導波板の端面から内部に光を照射する光源と、試料プローブが固定された導波板の表面を撮像する撮像部材とを備え、試料プローブに対して蛍光物質が標識された被解析用試料が結合された導波板内にて光を全反射させて導波する際に生じるエバネッセン波により蛍光物質を励起し、撮像された導波板の像に基づいて蛍光箇所の試料プローブにより被解析用試料を解析可能にしたことを特徴とする。

【 0 0 1 2 】

請求項 2 の発明は、表面に多数の試料プローブが固定された導波板内部に対し、光源からの光を入射させて導波させる際に生じるエバネッセン波により試料プローブに結合された被解析用試料に標識された蛍光物質を励起して蛍光させて導波

板の像に基づいて蛍光箇所の試料プローブにより被解析用試料を解析することを特徴とする。

【0013】

【発明の実施形態】

以下、本発明の実施形態を図に従って説明する。

図1は試料チップ解析装置の全体斜視図、図2は解析装置の原理図である。

【0014】

試料チップ解析装置1のテーブル3側方には遮光ボックス5が設けられ、該遮光ボックス5内には光源7が内蔵されている。また、遮光ボックス5には後述する試料チップ9の導波板11がほぼ密着状態で差し込み可能な開口13が形成され、テーブル3上に載置された導波板11の端部が挿嵌される。

【0015】

なお、開口13の内周面にはパッキング12が取り付けられ、後述する光源7からの光が導波板11内部以外に露光しないように構成される。

【0016】

遮光ボックス5内に收容される光源7としては、後述する被解析用試料に標識される蛍光物質の励起波長に応じて決定され、例えば被解析用試料に標識される蛍光物質が単一の場合には、該蛍光物質を励起させる特定波長の光を出力するレーザー照射装置や、標識される蛍光物質が複数の場合には夫々の励起波長を有した白色光を照射するものであればよい。

【0017】

テーブル3上にセットされる試料チップ9は光の導波特性を有したスライドガラスや薄手状ガラス板を所定の微小間隔において相対配置した導波板11上に、DNAプローブやRNAプローブ等のポリヌクレオチドプローブや蛋白質のペプチドプローブ等の多数の試料プローブ15を、所定の密度（数千～数万個/cm²）で、互いに所定の間隔（200μm）をおいたドット状に付着固定してなる。

【0018】

テーブル3上にセットされた試料チップ9の上方には試料チップ9表面の撮像

装置 1 7 が配置される。該撮像装置 1 7 としては試料チップ 9 の全体又は所定区画ごとに撮像する、例えば CCD カメラが適している。撮像装置 1 7 による試料チップ 9 の撮像範囲としては試料チップ 9 の全体に限定されるものではなく、試料チップ 9 全体を複数コマで撮像するものであってもよい。

【 0 0 1 9 】

なお、撮像装置 1 7 には RGB フィルタが内蔵され、該 RGB フィルタにより撮像データを各色に分解して色付き撮像データをバッファメモリ 1 9 に記憶させる。そして CPU 2 1 はバッファメモリ 1 9 に記憶された各色の撮像データを表示装置 2 3 に出力して試料チップ 9 の全体像を表示させる。

【 0 0 2 0 】

次に、上記した試料チップ解析装置 1 による被解析用試料の解析方法を説明する。

図 3 はスライドガラスにおける光の導波状態を示す説明図、図 4 は図 3 における A 箇所の拡大図である。

【 0 0 2 1 】

解析方法を DNA 解析例に基づいて説明すると、試料チップ 9 に配列固定された試料プローブ 1 5 に対して被解析用試料をハイブリダイズするには、細胞や生体組織から抽出して調整された被解析用試料を含んだ緩衝液を試料チップ 9 の表面に付着させて所定時間、放置する。このとき、被解析用試料と試料プローブ 1 5 とが、互いに相補的な場合には掛け合わさって 2 本鎖構造になり、反対に異なる場合には非結合状態に保たれる。

【 0 0 2 2 】

そして試料プローブ 1 5 と被解析用試料とがハイブリダイズするのに必要な時間を経過した後に、試料チップ 9 の上面を、純水や緩衝液により洗浄して試料プローブ 1 5 に対して非結合の被解析用試料を除去する。

【 0 0 2 3 】

次に、テーブル 3 上に試料チップ 9 を、その端部が開口 1 3 内に挿嵌するように差し込んだ後、光源 7 を駆動して出力される光を導波板 1 1 の端面から内部に入射させると、導波板 1 1 内に入射した光は内部における入射角が臨界角以上に

なって全反射しながら試料チップ 9 の他方端部側へ導波させられる。

【 0 0 2 4 】

このとき、試料チップ 9 の表裏面においては内部にて全反射する際にエバネッセン波が発生し、一部が試料チップ 9 の外面側にしみ出し、しみ出した光の電場により試料プローブ 1 5 にハイブリダイズされた被解析用試料に標識された蛍光物質を励起して蛍光させる。

【 0 0 2 5 】

その際、試料チップ 9 の各試料プローブ 1 5 のハイブリダイズされた被解析用試料に標識される蛍光物質が異なる場合には光源 7 として RGB が混色した白色光を使用することにより各蛍光物質を夫々の色で蛍光させることができるが、この場合にあっては各蛍光物質の励起エネルギーが低いため、光源の出力を高くする必要がある。

【 0 0 2 6 】

オペレータは撮像装置 1 7 により蛍光物質が蛍光した試料チップ 9 表面の像を撮像して表示装置 2 3 に表示させ、蛍光した試料プローブ 1 5 に基づいて該試料プローブ 1 5 にハイブリダイズした被解析用試料を特定して解析作業を終了する。

【 0 0 2 7 】

本実施形態は、導波板 1 1 内部を全反射しながら進行する光によるエバネッセン波により試料プローブ 1 5 にハイブリダイズした被解析用試料に標識された蛍光物質を蛍光させるため、外部から各試料プローブ 1 5 に光（励起光）を照射して蛍光物質からの蛍光を受光する従来の方法に比べて、蛍光と共に反射励起光を受光することがないため、励起光の影響を遮断して蛍光のみを効率的に検出することができ、解析精度を高めることができる。

【 0 0 2 8 】

また、解析作業は試料チップ 9 表面の撮像データから蛍光している試料プローブ 1 5 を特定して行うため、従来のように光を走査する方式に較べて解析時間を大幅に短縮することができる。

【 0 0 2 9 】

【発明の効果】

本発明は、蛍光物質の励起光や外乱光に影響されることなく試料プローブに結合された被解析用試料に標識された蛍光物質からの蛍光を確実に、かつ高精度に検出して被解析用試料の解析作業を効率化することができる。また、一度に異なる波長の蛍光を高精度に検出して解析作業を効率化することができる。

【図面の簡単な説明】

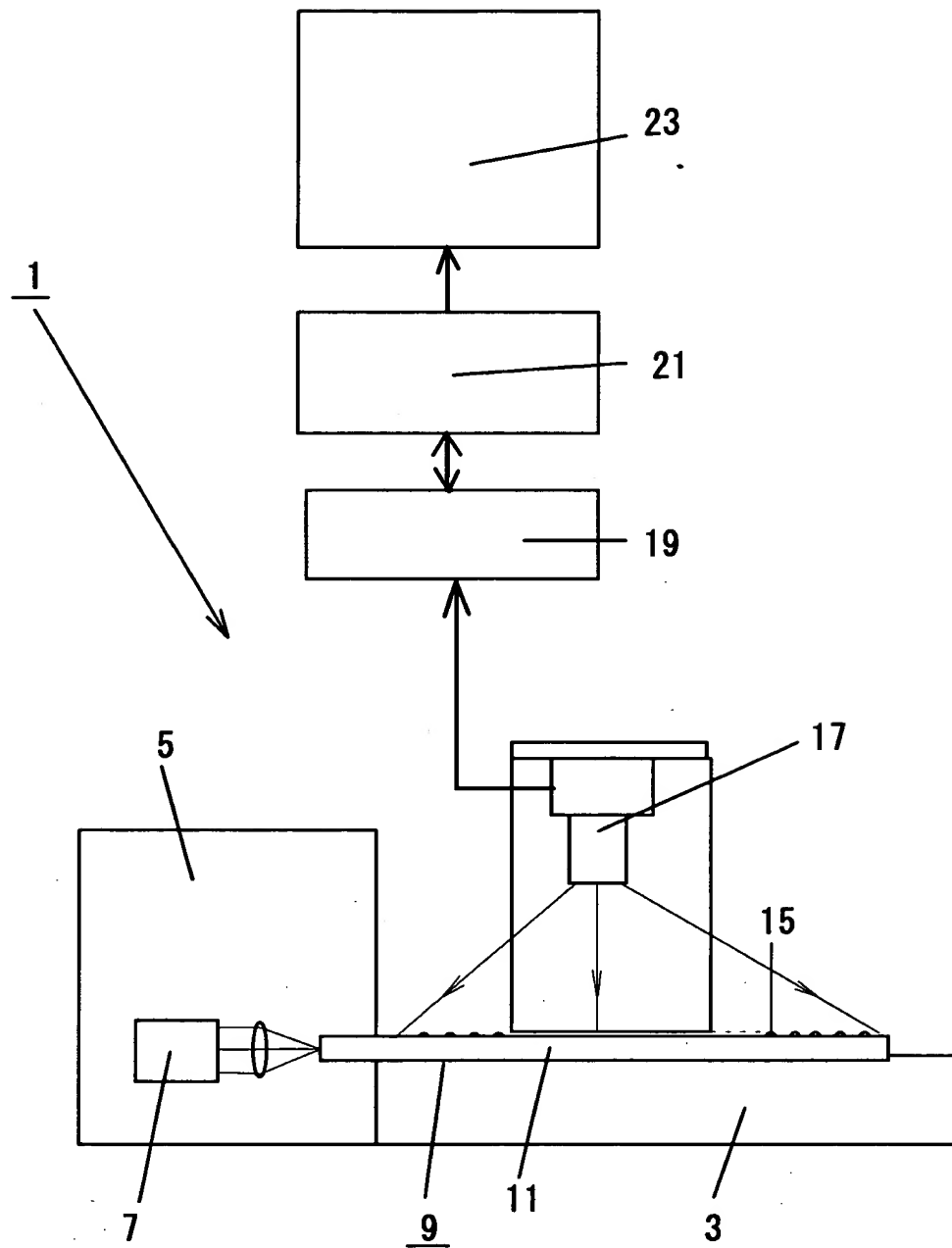
【図 1】 試料チップ解析装置の全体斜視図である。

【図 2】 解析装置の原理図である。

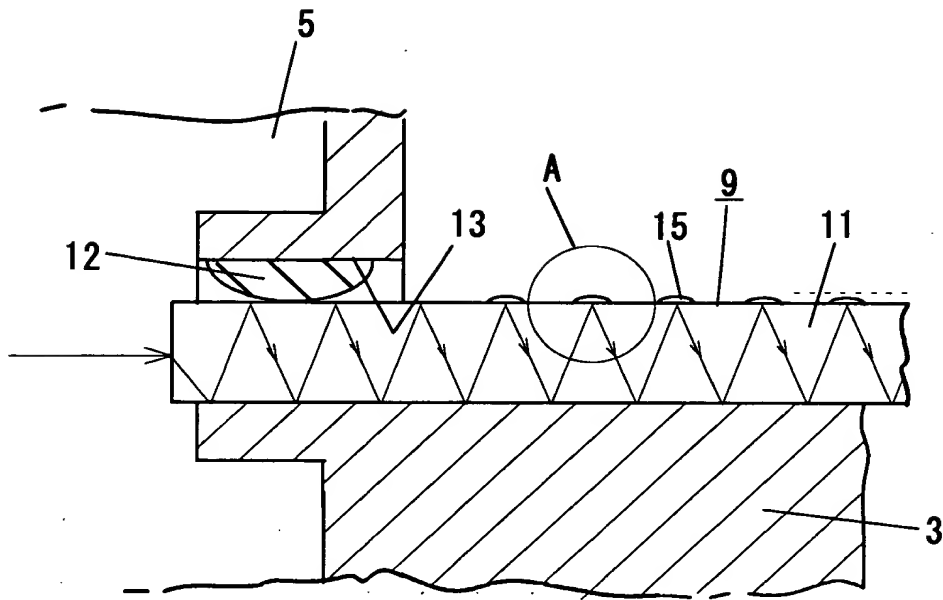
【図 3】 スライドガラスにおける光の導波状態を示す説明図である。

【図 4】 図 3 における A 箇所の拡大図である。

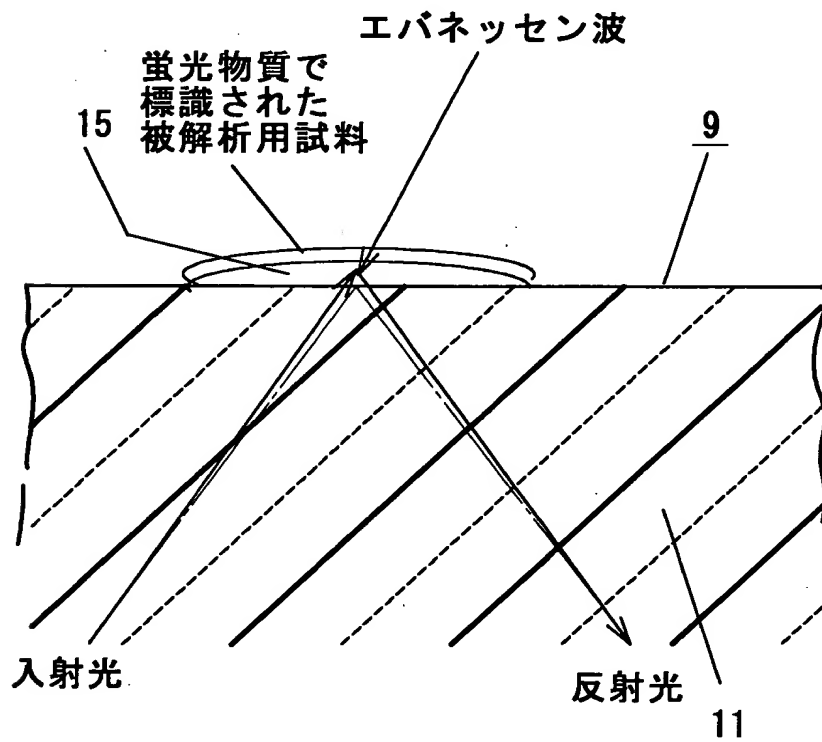
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 蛍光物質の励起光や外乱光に影響されることなく試料プローブに結合された被解析用試料に標識された蛍光物質からの蛍光を確実に、かつ高精度に検出して被解析用試料の解析作業を効率化することができる試料チップ解析装置及び解析方法を提供する。一度に異なる波長の蛍光を高精度に検出して解析作業を効率化することができる試料チップ解析装置及び解析方法を提供する。

【解決手段】 一定厚さで入射される光を全反射して導波可能で、表面に多数の試料プローブが固定される導波板の端面に対して光源から光を内部に照射する。撮像部材により試料プローブが固定された導波板の表面を撮像する。試料プローブに対して蛍光物質が標識された被解析用試料が結合された導波板内にて光を全反射させて導波する際に生じるエバネッセン波により蛍光物質を励起して蛍光させる。撮像された導波板の蛍光像により被解析用試料を解析する。

【選択図】 図 1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-205265
受付番号	50000851673
書類名	特許願
担当官	第三担当上席 0092
作成日	平成12年 7月 7日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年 7月 6日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000230467]

1. 変更年月日	1996年 6月21日
[変更理由]	住所変更
住 所	名古屋市熱田区三本松町20番9号
氏 名	日本レーザ電子株式会社